

КРЕСТОВА ЕКАТЕРИНА ИВАНОВНА

**ВЛИЯНИЕ РИБОСОМАЛЬНЫХ КОМПОНЕНТОВ И
ПРОТЕОГЛИКАНОВ БАКТЕРИЙ НА МИКРОБНЫЕ СООБЩЕСТВА И
МЕХАНИЗМЫ ПРОТИВОИНФЕКЦИОННОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ**

03.02.03 – микробиология

А в т о р е ф е р а т

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Нижний Новгород – 2017

Работа выполнена на кафедре микробиологии и иммунологии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования "Нижегородская государственная медицинская академия" Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор

Маянский Андрей Николаевич

доктор биологических наук, профессор

Заславская Майя Исааковна

Официальные оппоненты:

Соловьева Ирина Владленовна, доктор биологических наук, доцент, федеральное бюджетное учреждение науки «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной, лаборатория микробиома человека и средств его коррекции, заведующий лабораторией

Давыдов Дмитрий Сергеевич, кандидат биологических наук, федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, лаборатория бактериофагов и препаратов нормофлоры с коллекцией микроорганизмов Испытательного центра экспертизы качества медицинских иммунобиологических препаратов, заведующий лабораторией

Ведущая организация: федеральное бюджетное учреждение науки «Казанский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Защита диссертации состоится «___» _____ 2017 г. в _____ на заседании диссертационного совета Д 212.081.36 при ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: 420055, г. Казань, ул. Карла Маркса, д. 74, в зале заседания ученого совета (аудитория №205А)

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. Н.И. Лобачевского при Казанском (Приволжском) федеральном университете.

Автореферат разослан «___» _____ 2017 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
д.б.н., профессор

З.И. Абрамова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Заболеваемость бактериальными инфекциями верхних дыхательных путей в человеческой популяции имеет стабильно высокий уровень (Петрова Л.Г., 2008, Кунельская Н.Л. и др., 2015). Микробный спектр возбудителей таких инфекций разнообразен (Заплатников А.Л. и др., 2011, Лопатин А.С. и др., 2013) и включает патогены, способные к персистенции (Бухарин О.В., 1999). Постоянная циркуляция бактерий, вызывающих инфекции респираторного тракта, поддерживается различными факторами микробной патогенности, такими как капсулообразование (для *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *K. pneumoniae* и др.), высокая инвазивность (*S. pyogenes*) и пр. При этом множественность серотипов, антигенная мимикрия, а также Т-независимость капсульных антигенов у бактерий препятствуют формированию продолжительного иммунитета (Маянский А.Н., 2006) и способствуют реинфекции, что особенно выражено у детей. Известно, что при контакте с возбудителями инфекций, в первую очередь, вырабатываются антитела к поверхностным антигенам (Esposito S. et al., 2003), которые наиболее изучены (Rossi G.A. et al., 2003, Attarpour-Yazdi M.M. et al., 2014, Post D.M. et al., 2016). В то же время, при длительных и постоянных контактах с патогенами в организме человека начинают появляться антитела и к внутренним антигенам микроорганизмов (качественная сероконверсия) (Шахгильдян И.В. и др., 2003, Леви Д.Э., 2010, Сокурова А.М., 2014, Claman R. et al., 1997), которые также могут быть инициаторами иммунного ответа. Поэтому исследование влияния внутриклеточных рибосомных компонентов и мембранных протеогликанов бактерий, часто колонизирующих респираторный тракт, на функциональную активность различных эффекторов противоинфекционной резистентности представляет научный интерес.

Степень разработанности темы исследования

Последние работы, посвященные бактериальным внутренним компонентам (рибосомным белкам и пр.), отражают, преимущественно, важность их использования в диагностике инфекционных заболеваний (Slinger V.L. et al., 2015, Yamazaki T. et al., 2015). Существует также большой ряд работ, в которых внутренние компоненты бактерий рассматривают с точки зрения их иммуномодулирующих свойств. Так, на основе бактериальных рибосом и протеогликанов бактерий, вызывающих респираторные инфекции – *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* и *Haemophilus influenzae* – был сконструирован препарат «Рибомунил». Имеется значительное число работ, указывающих на иммуномодулирующее действие данного препарата по результатам клинических исследований (Борисова А.М. и др., 1994, Карпова Е.П. и др., 2015, Moniuszko T. et al., 1995, Serrano E. et al., 1997, Mora R. et al., 2007, Olivieri D. et al., 2009, Villa-Ambriz J. et al., 2012, Fiocchi A. et al., 2012). Также существуют единичные публикации по изучению воздействия внутренних компонентов бактерий на различные звенья

иммунитета *in vitro*: дендритные клетки (Jongmans W. et al., 2005, Peng J.C. et al., 2005, Quillien V. et al., 2005, Cloosen S. et al., 2009), индукцию синтеза цитокинов (Pujol J.L. et al., 1991, Herberhold S. et al., 2011) и пр. (Caliot E. et al., 2000). Однако, в вышеуказанных работах рибосомальные компоненты и протеогликаны бактерий, вызывающих инфекции респираторного тракта, рассматриваются исключительно как иммуномодуляторы, при этом игнорируется возможность их участия в патогенезе заболевания. Так, до сих пор не проводилось комплексного исследования механизмов взаимодействия внутренних компонентов бактерий, наиболее часто инфицирующих дыхательные пути, с факторами «первой линии» противоинфекционной защиты организма, такими как эпителий слизистых оболочек, нормальная микрофлора, нейтрофилы, а также их способности индуцировать синтез протективных антител. Таким образом, в современной микробиологии имеется пробел, касающийся вопроса роли внутренних (рибосомных и мембранных) компонентов бактерий в патогенезе респираторных инфекций, которые вызываются часто встречаемыми возбудителями, например, такими как *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae* и *K. pneumoniae* (Французов Б.Л., Французова С.Б., 1988, Заплатников, А.Л. и др., 2011).

Цель исследования: оценить реактивность эпителиоцитов и нейтрофилов человека, жизнеспособность микробных сообществ, а также образование специфических антител у людей после контакта с комплексом рибосомальных компонентов *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae* и протеогликанами мембраны *Klebsiella pneumoniae*.

Задачи исследования:

1. Оценить влияние бактериальных рибосомальных компонентов и протеогликанов на рецепторную активность буккальных эпителиоцитов в отношении грибов *Candida albicans* *in vitro*.
2. Изучить воздействие рибосомальных компонентов и протеогликанов на кислород-зависимую реактивность нейтрофилов крови человека.
3. Исследовать влияние рибосомальных компонентов и протеогликанов бактерий на формирование и структурную целостность биопленки, образованной *Pseudomonas aeruginosa*.
4. Определить антителостимулирующие свойства рибосомальных компонентов *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae* и протеогликанов *Klebsiella pneumoniae* у здоровых людей и больных детей с различными хроническими патологиями.

Научная новизна исследования

Впервые обнаружено, что рибосомные компоненты *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *K. pneumoniae* и протеогликаны *K. pneumoniae* снижают адгезию *C. albicans* к эпителиоцитам через подавление работы

адгезивного аппарата буккальных клеток и выделение ими метаболитов, снижающих адгезию кандид.

Установлен прямой и комплемент-зависимый механизм активации кислород-зависимого метаболизма нейтрофилов крови рибосомальными компонентами и протеогликанами.

Впервые исследовано взаимодействие рибосомных компонентов *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *K. pneumoniae* и протеогликанов *K. pneumoniae*, а также метаболитов *S. aureus* и *S. epidermidis* со структурированным микробным сообществом, образованным *P. aeruginosa* in vitro. Показано, что метаболиты *S. aureus* подавляют формирование и нарушают целостность биопленки *P. aeruginosa*.

Впервые определены титры сывороточных антител к комплексу рибосом *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *K. pneumoniae* и протеогликанам *K. pneumoniae* у здоровых людей разного возраста и больных детей с хроническими воспалительными заболеваниями толстого кишечника, хроническим энтеритом и целиакией, муковисцидозом, бронхиальной астмой, хроническим гастродуоденитом, атопическим дерматитом и хроническими вирусными гепатитами.

Теоретическая и практическая значимость работы

Изучено действие комплекса рибосомных компонентов *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *K. pneumoniae* и протеогликанов *K. pneumoniae* на биопленку *P. aeruginosa*, что расширяет знания о влиянии внутренних компонентов бактерий, колонизирующих респираторный тракт на процессы, протекающие в микробных сообществах. Получены новые данные о механизмах взаимодействия бактериальных рибосомальных структур и протеогликанов мембраны с факторами «первой линии» противоинфекционной защиты, такими как мукозальные эпителиоциты и нейтрофильные гранулоциты. Была разработана оригинальная тест-система на основе ИФА, с помощью которой был проведен мониторинг содержания уровня сывороточных иммуноглобулинов к внутренним компонентам *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae* и *K. pneumoniae* у здоровых доноров и детей с различными хроническими патологиями.

Разработанные методы используются в работе лаборатории клинической иммунологии и молекулярной диагностики ФГБУ «ПФМИЦ» Минздрава России (г. Нижний Новгород) (акт о внедрении от 13 января 2016 года), а также в учебном процессе – на кафедре микробиологии и иммунологии ФГБОУ ВО НижГМА Минздрава России (г. Нижний Новгород) (акт о внедрении от 3 декабря 2015 года).

Методология исследования

Предметом исследования стали взаимоотношения рибосомных компонентов и мембранных протеогликанов бактерий с микробной биопленкой и отдельными эффекторами противоинфекционной защиты. Планирование и проведение исследований, направленных на решение

поставленных задач, осуществлялось на основе общенаучных и специфических методов. Основными объектами исследования явились бактерии видов *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, микровицеты *Candida albicans*, рибосомальные компоненты *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae* и протеогликаны *Klebsiella pneumoniae*, буккальные эпителиоциты, сыворотка крови человека, цельная кровь, нейтрофилы крови. Работа выполнена с применением современного поверенного оборудования, использовались бактериологические, иммунохимические методы, методы выделения клеток, а также статистический анализ.

Материалы и методы исследования

В исследованиях использовали штаммы *Staphylococcus aureus* 5983/2, 18А, 5663, 5583, *Staphylococcus epidermidis* 178М, 3287/5, *Pseudomonas aeruginosa* 485, *Serratia marcescens* 514, а также *Candida albicans* штамм 601 из коллекции кафедры микробиологии и иммунологии ФГБОУ ВО НижГМА Минздрава России.

В работе применяли рибосомальные компоненты *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Klebsiella pneumoniae* и протеогликаны *Klebsiella pneumoniae* (РКП), получаемые из коммерческого таблетированного препарата «Рибомунил» (Pierre Fabre Medicament Production, Франция), содержащего бактериальные рибосомы *K. pneumoniae* (3.5 доли), *S. pneumoniae* (3.0 доли), *S. pyogenes* (3.0 доли), *H. influenzae* (0.5 доли), титрованные до 70% РНК – 750 мкг, протеогликаны мембранной части *K. pneumoniae* (15 долей) – 1,125 мг, вспомогательные вещества: кремний коллоидный гидрофобный (1,5 мг), магния стеарат (6 мг), сорбитол (до 294 мг). Рибомунил растворяли карбонат-бикарбонатным буфером (рН 9,5), забуференным физиологическим раствором (ЗФР) или раствором Хенкса без индикатора (1 мг/мл) и ресуспендировали ультразвуком (УЗДН-2Т, Россия; 2 мин, 22 кГц) (Сибирякова Н.И., 1992). Полученную суспензию освобождали от корпускулярных добавок центрифугированием (3000g, 10 мин); далее использовали надосадочную жидкость. Наличие рибосомных компонентов бактерий до и после ультразвуковой обработки и центрифугирования оценивали по сохранению в пробе РНК с помощью метода количественного определения нуклеиновых кислот по Спирину (Коротяев А.И. и др., 1980, Коннова С.А. и др., 2013), а также с помощью определения концентрации белка на анализаторе акустическом компьютеризированном АКБа-01-«БИОМ» (ЗАО Фирма «БИОМ», Россия). Общее содержание белка составило: до обработки – $360,45 \pm 1,1$ г/л, после – $347,6 \pm 1,0$ г/л, РНК: до обработки – $1 \pm 0,05$ мг/мл, после – $1 \pm 0,07$ мг/мл. Раствор доводили до рабочей концентрации, в зависимости от задачи опыта.

Были исследованы 302 образца сыворотки крови человека: 71 сыворотка здоровых взрослых доноров (Нижегородский областной центр крови им. Н.Я. Климовой, Н. Новгород), 35 сывороток от здоровых детей 11-14 лет (Научный

центр здоровья детей РАМН, Москва), 171 сыворотка детей и подростков 4 мес.–17 лет с различными патологиями (ФГБУ «ПФМИЦ» Минздрава России, ГБУЗ НО «НОДКБ»), 25 сывороток пуповинной крови (Научный центр здоровья детей РАМН, Москва). В экспериментах также были использованы 18 образцов цельной гепаринизированной крови здоровых доноров.

Микробиологические методы.

Для культивирования микроорганизмов использовали питательные среды: трипсинизированный соевый бульон (ТСБ) (Becton, Dickinson and Company, США), агар Сабуро (HiMedia, Индия), питательный агар (Биотехновация, Россия) и среда LB (Difco laboratories, США), приготовленная по методу Bertani (Коробов В.П. и др., 2003). Микроорганизмы культивировали в течение 24-48 часов при 37⁰С в аэробных условиях.

Идентификацию видовой принадлежности микроорганизмов проводили, используя диагностические тест-системы STAPHYtest-24 (ERBA Lachema, Чехия), API-Staph, API 20 NE (BioMerieux, Франция), хромогенную среду Hi Chrome агар (Hi Media, Индия). Также был использован метод прямого профилирования (технология MALDI-TOF MS) на масс-спектрометре Microflex (Bruker Daltonics, Германия) с азотным лазером 337 нм и программный пакет Maldi Biotyper automatic.

Биопленку *P. aeruginosa* выращивали в пластиковых планшетах на среде LB в течение 48 ч. Затем осторожно отмывали раствором Хенкса и добавляли к ней раствор РКП (0,15 мг/мл) и фильтраты штаммов стафилококка, получаемые при выращивании 24-часовых культур *S. aureus* и *S. epidermidis* на среде ТСБ с 1% глюкозой. Бульонные культуры стандартизовали по количеству бактериальных клеток (10⁶ КОЕ) и пропускали через бактериальный фильтр, задерживающий частицы более 0,45 мкм в диаметре. В контроле добавляли раствор Хенкса или питательную среду ТСБ, а также использовали лунки, не засеянные *P. aeruginosa*. Инкубировали планшеты (2 ч, 37⁰С). В ряде опытов данные вещества вносили непосредственно при посеве *P. aeruginosa*. Оценку интенсивности биопленкообразования проводили согласно методу, основанному на окраске анилиновыми красителями биопленок, фиксированных в лунках планшета (Чеботарь И.В., 2013).

Тесты с выделением клеток

Клетки буккального эпителия получали от 55 доноров (мужчин и женщин 18-30 лет), утром, натощак, с внутренней поверхности щеки, дважды отмывали (40g, 5 мин) забуференным физиологическим раствором (ЗФР), готовили взвесь с концентрацией 10⁶ кл/мл. Исследовали адгезивные взаимодействия в экспериментальной тест-системе «буккальные эпителиоциты – *Candida albicans*» по ранее разработанному методу (Махрова Т.В., 2004).

Взвесь лейкоцитов, содержащих 60-70% нейтрофилов, получали из крови с помощью декстрана Т-500 (Шабунина Е.И. и др., 2010). Для детекции люминол-опосредованной хемилюминесценции нейтрофилов, использовали

96-луночные микропланшеты White Cliniplate 96 well (Thermo Scientific, Швеция), в которые вносили по 100 мкл лейкозвеси и раствора люминола (10^{-3} М) (Sigma, США). После инкубации (5 мин, 37°C) добавляли 50 мкл раствора РКП (0,15 мг/мл) или зимозан, опсонизированный сывороткой человека (ОЗ) (10 мг/мл), в растворе бесцветного Хенкса). Приготовление люминола и ОЗ проводили согласно стандартной методике (Заславская М.И., 2009). Замер уровня хемилюминесценции (ХЛ) проводили в течение 60 мин на хемилюминометре Luminoscan Ascent (Швеция). Результаты выражали в относительных световых миллиединицах (mRLU). В ряде экспериментов проводили предынкубацию (35 мин) лейкозвеси со следующими факторами: РКП в дозировке ниже стимулирующего действия (0,02 мг/мл) или ЛПС *E.coli* серотип O127:B8 (Sigma, США) (100 мкг/мл).

Иммунохимические методы

Для постановки НСТ-теста применяли стандартный метод (Щербаков В.И., 1989). В качестве стимуляторов использовали препарат РКП (0,15 мг/мл), *S. marcescens* (2×10^9 кл/мл) и неопсонизированный зимозан (10 мг/мл). В ряде опытов реакцию проводили в присутствии 0,01 М ЭДТА, который подавлял активацию комплемента по классическому и альтернативному путям, или в присутствии 0,01 М ЭГТА и 0,01 М MgCl_2 – для избирательного подавления классического каскада.

Уровень сывороточных антител к комплексу РКП бактерий определяли методом иммуноферментного анализа. Использовали 96-луночные полистироловые планшеты (НИИ «Медполимер», Москва). Раствор РКП в концентрации 10 мкг/мл, разведенный карбонат-бикарбонатным буфером, сорбировали в планшетах (1 ч, 37°C). После инкубации планшеты отмывали фосфатно-солевым раствором с твином (ФСР-Т). В качестве контроля использовали препарат нормального иммуноглобулина (ИГ) человека (Областной центр крови им. Н.Я. Климовой, Н. Новгород). ИГ и сыворотки вносили в разных титрах, инкубировали (30 мин, 37°C). После отмывания ФСР-Т вносили конъюгаты для выявления IgG (ООО «Сорбент», Подольск) или IgM («Medac», Германия). Планшеты инкубировали повторно (30 мин, 37°C). Несвязавшиеся реагенты удаляли отмыванием, после чего вносили субстратный раствор с хромогеном, затем инкубировали (15 мин, 25°C) в темноте. Реакцию останавливали внесением 2 М серной кислоты. Для подтверждения специфичности реакций проводили «истощение» ИГ препаратом РКП (негативный контроль), добавляя одну часть раствора РКП к двум частям ИГ (60 мин, 37°C). Учет результатов проводили с помощью микропланшетного фотометра Multiscan EX (Финляндия) при длине волны 450 нм. Титр реакции определяли по максимальному разведению, в котором регистрировали показатели оптической плотности $>0,2$.

Статистическая обработка результатов. Статистическую обработку проводили при помощи стандартных пакетов программ Statistica 6.1, Prism 5 и Microsoft Excel 2007. Каждая выборка данных оценивалась на принадлежность

к нормальному распределению. Данные представляли в виде среднего арифметического (M) и стандартной ошибки среднего (m). В случае, если распределение данных в выборках не характеризовалось как нормальное, использовали непараметрические методы анализа, рассчитывая медиану (Me). Достоверность различий оценивали по критерию Манна-Уитни. Различия между независимыми группами считали статистически значимыми при вероятности ошибки $p < 0,05$.

Личное участие автора в получении результатов

Автором проведен аналитический обзор литературы, самостоятельно выполнены основные этапы бактериологических исследований, исследования с выделением клеток, иммунохимические тесты, анализ полученных данных, статистическая обработка и обобщение полученных результатов. Подбор групп детей проводился совместно со специалистами ФГБУ ННИИДГ Минздрава России и ГБУЗ НО «НОДКБ» в.н.с. Маянской И.В. и доцентом кафедры факультетской и поликлинической педиатрии ФГБОУ ВО НижГМА Минздрава России Абелевич М.М.. Идентификация бактерий по технологии MALDI-TOF MS проводилась специалистами НИИ педиатрии Научного центра здоровья детей РАМН. Моделирование биопленок осуществлялось совместно с доцентом кафедры микробиологии и иммунологии ФГБОУ ВО НижГМА Минздрава России И.В. Чеботарем, исследование влияния ЛПС на адгезию кандид к эпителиоцитам проводилось совместно с ассистентом той же кафедры Луковой О.А. при непосредственном участии автора. Количественная оценка белка в препарате выполнялась врачом КЛД лаборатории биохимии и неотложной диагностики ФГБУ «ПФМИЦ» Минздрава России Стрелковой И.Г..

Положения, выносимые на защиту

1. Рибосомальные компоненты *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Klebsiella pneumoniae* и протеогликаны *Klebsiella pneumoniae* снижают рецепторную активность буккальных эпителиоцитов в отношении *Candida albicans*, а также стимулируют нейтрофильные гранулоциты, но не меняют их способность реагировать на последующие стимулы.
2. Присутствие в среде рибосомных компонентов *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Klebsiella pneumoniae* и протеогликанов *Klebsiella pneumoniae* не влияет на формирование и структурную целостность биопленки *Pseudomonas aeruginosa*.
3. У здоровых взрослых и детей, а также детей с различными хроническими патологиями (бронхиальная астма, муковисцидоз, атопический дерматит, хронические воспалительные заболевания толстого кишечника, хронический энтерит и целиакия, хронические вирусные гепатиты) в сыворотке крови обнаружены IgG к комплексу рибосомных компонентов *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Klebsiella pneumoniae* и протеогликанов *Klebsiella pneumoniae*.

Степень достоверности и апробация результатов исследования

Степень достоверности результатов исследований подтверждается объемом исследуемой выборки. Проведены и проанализированы результаты 73 серий лабораторных экспериментов, что включает более 700 анализов.

Диссертация прошла апробацию на расширенном заседании кафедры микробиологии и иммунологии ФГБОУ ВО НижГМА Минздрава России 04 февраля 2016 г. (протокол № 17), а также на заседании кафедры микробиологии ФГАОУ ВО Казанский (Приволжский) федеральный университет 27 июня 2016 г. (протокол № 11).

Основные результаты диссертации были доложены на I Всероссийской XII научной сессии молодых ученых и студентов с международным участием "Современные решения актуальных научных проблем в медицине" (Нижний Новгород, 2013), научно-практической конференции по медицинской микологии (XVI Кашкинские чтения) (Санкт-Петербург, 2013), а также на Всероссийской научно-практической конференции, посвященной 95-летию ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной «Инновационные технологии в противоэпидемической защите населения» (Нижний Новгород, 2014).

Публикации

Результаты проведенного диссертационного исследования изложены в 8 научных работах, опубликованных автором, из которых 5 статей опубликованы в изданиях, включенных в Перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий ВАК, и 3 работы опубликованы в сборниках материалов конференций.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 120 страницах текста и состоит из введения, обзора литературы, результатов собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспектив дальнейшей разработки темы, списка сокращений и условных обозначений, благодарностей, списка литературы. Диссертация иллюстрирована 7 таблицами и 19 рисунками. Библиографический указатель включает 213 источников, в том числе 103 ссылки на отечественных авторов и 110 ссылок на зарубежных авторов.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Влияние рибосомальных компонентов *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Klebsiella pneumoniae* и протеогликанов *Klebsiella pneumoniae* на рецепторную активность буккальных эпителиоцитов в отношении *Candida albicans*

Влияние компонентов внутренних структур бактерий на адгезивные взаимодействия буккальных эпителиоцитов оценивали в опытах с микробной тест-культурой *Candida albicans* in vitro (метод искусственной колонизации). Добавление РКП в тест-систему «буккальные эпителиоциты – *Candida albicans*» приводило к снижению адгезии кандид в 1,58 – 3,12 раз ($p=0,001166$) (рис. 1, 2). В то же время, отметим, что различные компоненты и факторы

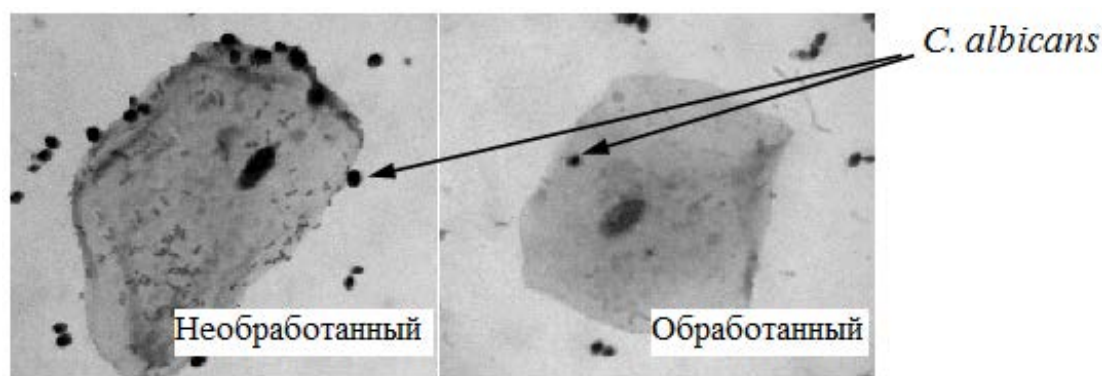


Рисунок 1 – Влияние комплекса рибосомальных компонентов *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Klebsiella pneumoniae* и протеогликанов *Klebsiella pneumoniae* на адгезию *Candida albicans* к буккальным эпителиоцитам (увеличение 10x100, окраска азуром А).

бактериальной природы могут по-разному влиять на адгезивные взаимодействия в системе «кандиды-эпителиоциты». Как показали наши дополнительные эксперименты, липополисахарид (ЛПС) *Escherichia coli* серотип O127:B8 (100 нг/мл, 100 мкг/мл), в отличие от комплекса РКП, усиливал ($p=0,000658$, $p=0,028571$) прикрепление кандид к буккальным эпителиоцитам. Специфика взаимоотношений буккальных эпителиоцитов с микробными компонентами проявилась также и в реакциях с супернатантом суточной культуры *Staphylococcus epidermidis* штамм 327/5: ни одна из использованных дозировок (0,1 мл и 0,5 мл) не влияла на прикрепление *Candida albicans* к буккальным клеткам. Отметим, что жизнеспособность буккальных эпителиоцитов во всех вышеуказанных экспериментах не менялась.

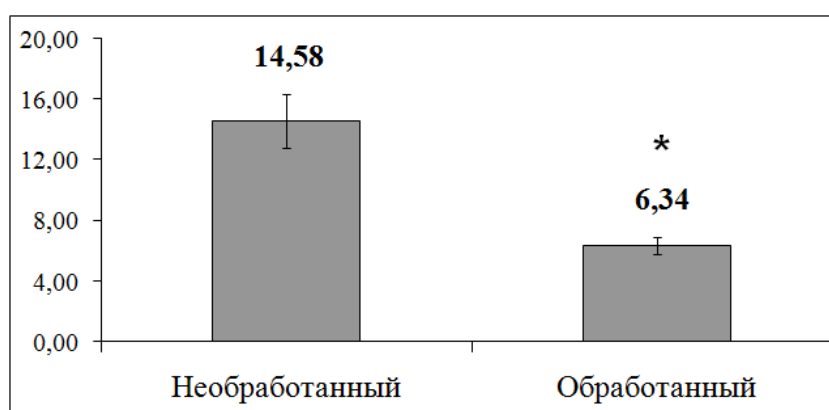


Рисунок 2 – Влияние комплекса рибосомальных компонентов *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Klebsiella pneumoniae* и протеогликанов *Klebsiella pneumoniae* на адгезию *Candida albicans* к буккальным эпителиоцитам.

Примечание: * – статистически значимые различия относительно контроля (забуференный физиологический раствор).

Для выяснения вопроса о механизме антиадгезивного действия РКП, были проведены дополнительные серии опытов. В первой серии экспериментов буккальные клетки (0,5 мл суспензии в ЗФР) инкубировали с РКП (0,1 мл), затем эпителиальные клетки тщательно отмывали, добавляли взвесь *C. albicans* и ко-инкубировали. В контроле вместо компонентов внутренних структур бактерий использовали ЗФР. Наблюдалось снижение показателей адгезии в 1,53 раза по сравнению с контролем ($15,72 \pm 0,91$ против $23,98 \pm 1,25$) ($p=0,028571$). Это показывало то, что РКП меняют (снижают) активность рецепторного аппарата эпителиоцитов в отношении кандид.

Во второй серии экспериментов изучали влияние супернатанта, полученного при инкубации буккальных клеток с РКП, на адгезию кандид буккальными эпителиоцитами. Для этого буккальные клетки (0,5 мл суспензии в ЗФР) инкубировали с РКП (0,1 мл), затем центрифугировали (1000g, 5 мин) и отбирали супернатант. В контроле вместо буккальных клеток в пробирку помещали 0,5 мл ЗФР, затем туда же вносили 0,1 мл РКП – получали «разведенный» раствор РКП. Затем, либо супернатант, либо «разведенный» раствор РКП добавляли к системам «*C. albicans* – буккальные клетки». Учитывали уровень искусственной колонизации кандид после их инкубации с эпителиоцитами. Оказалось, что буккальные эпителиоциты продуцируют факторы, которые тормозят адгезию ($p=0,049367$) в системе «*C. albicans* – мукозальные клетки» (рис. 3). Так, при добавлении супернатанта показатель искусственной колонизации кандид составлял 2,15, а в контроле – 3,71 (разведенный РКП). Таким образом, под воздействием рибосомальных компонентов *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*, *K. pneumoniae* и *H. influenzae* и протеогликанов мембраны *K. pneumoniae* буккальные клетки продуцируют растворимые факторы, способные вызывать блокаду восприимчивости мукозальных эпителиоцитов в отношении кандид. Отметим, что в обоих экспериментах жизнеспособность буккальных клеток не менялась.

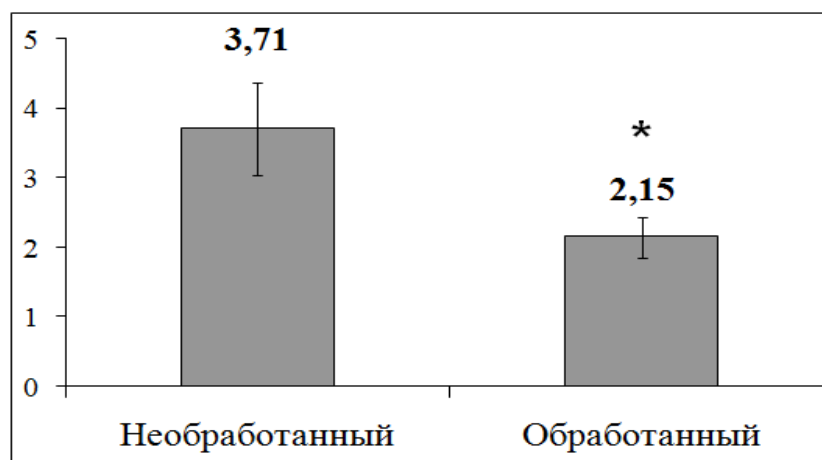


Рисунок 3 – Влияние супернатанта культуры буккальных клеток, инкубированных с рибосомальными компонентами и протеогликанами на адгезию *C. albicans* к буккальным эпителиоцитам.

Примечание: * – статистически значимые различия относительно контроля

В отдельной серии экспериментов исследовали прямое воздействие РКП на адгезивные структуры *C. albicans*. Для этого, суспензию кандид инкубировали (30 мин, 37⁰C) с раствором РКП в равных количествах (по 0,5 мл), затем кандиды тщательно отмывали, добавляли к буккальным эпителиоцитам и проводили их совместную инкубацию. В контроле вместо раствора РКП использовали ЗФР. Достоверных различий между опытом и контролем не наблюдалось ($13,7 \pm 1,48$ – в опыте и $14,47 \pm 1,48$ – в контроле). Это показывало, что РКП не оказывают прямого влияния на способность кандид прикрепляться к эпителиоцитам.

Действие рибосомальных компонентов *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Klebsiella pneumoniae* и протеогликанов *Klebsiella pneumoniae* на активацию и регуляцию кислород-зависимого метаболизма нейтрофилов крови человека

Влияние бактериальных рибосомных компонентов и протеогликанов на фагоцитарную активность нейтрофилов крови исследовали с помощью НСТ-теста (рис. 4). Установлено, что РКП *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*, *K. pneumoniae* и *H. influenzae*, обладают стимулирующей активностью в отношении нейтрофилов цельной крови ($p=0,000148$) (табл. 1).

Для подтверждения стимулирующего воздействия комплекса РКП на нейтрофилы был использован метод люминол-зависимой хемилюминесценции (ХЛ) с лейкоцитами, изолированными из крови с помощью декстрана Т-500. Максимальные показатели ХЛ в опытах с РКП бактерий наблюдались через 15-30 мин и почти в два раза превышали данные негативного контроля (опыты с раствором Хенкса) ($475,38 \pm 123,63$ mRLU против $241,16 \pm 56,68$ mRLU, $p=0,021159$), но были значительно ниже, чем в экспериментах, где в качестве стимулятора ХЛ был взят опсонизированный зимозан ($1289,75 \pm 413,88$ mRLU) (рис. 5). Это говорит о том, что бактериальные компоненты оказывали прямой стимулирующий эффект на НАДФ-оксидазную активность нейтрофилов и реализацию ими «респираторного взрыва» (Маянский А.Н., 2007).

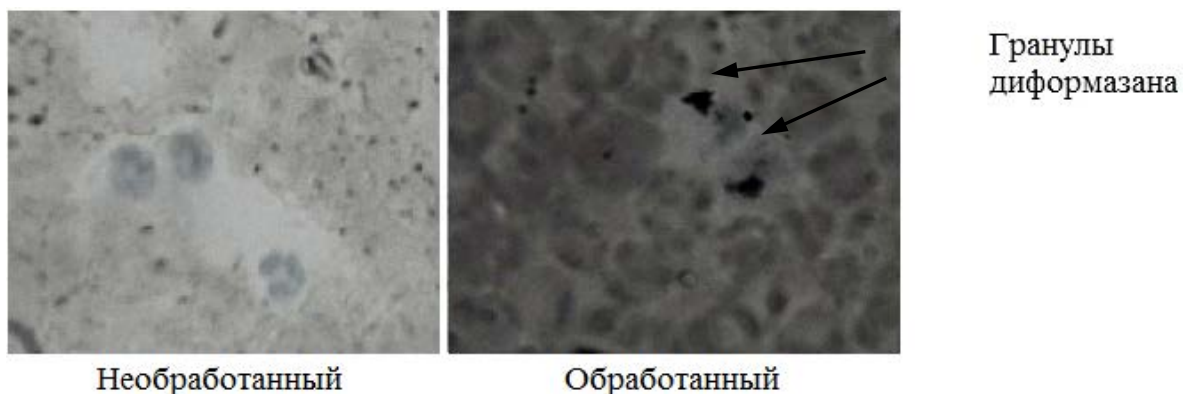


Рисунок 4 – НСТ-тест, индуцированный рибосомальными компонентами и протеогликанами бактерий. Темные гранулы диформаза внутри или на

поверхности активированных нейтрофилов образуются при восстановлении НСТ (окраска метиловым зеленым, увеличение 10x100).

Таблица 1 – Показатели НСТ-теста с цельной кровью

Стимулятор	M±m (%)	Медиана (%)	p (относительно контроля)
Спонтанная реакция (контроль)	6,8±0,57	7,0	-
РКП	51,0±2,1*	48,5	0,000148
РКП +ЭДТА	7,0±2,5	5,0	0,273802
РКП +ЭГТА+MgCl ₂	5,5±1,6	4,0	0,121241
<i>S. marcescens</i>	55,1±4,71*	50,0	0,000356
<i>S. marcescens</i> +ЭДТА	4,8±1,9	4,0	0,255272
<i>S. marcescens</i> +ЭГТА+MgCl ₂	2,5±1,9	1,0	0,121241
Зимозан	66,5±3,6*	64,5	0,004410
Зимозан+ЭДТА	6,8±1,0	7,0	1,000000
Зимозан+ЭГТА+MgCl ₂	22,3±4,6*	20,5	0,004454

Примечание: * – статистически значимые различия относительно контроля, РКП – рибосомальные компоненты и протеогликаны бактерий

В то же время нейтрофил-стимулирующая активность РКП, зарегистрированная с помощью ХЛ, была заметно менее выражена, чем реакция нейтрофилов на те же структуры, но оцененная методом НСТ. Это можно объяснить тем, что НСТ-тест с РКП может быть дополнительно опосредован гуморальными факторами, содержащимися в плазме крови, к которым, по нашим данным, относился классический каскад комплемента. Это подтверждалось экспериментами, в которых блокада классического пути комплемента с помощью ЭГТА и MgCl₂, равно как добавление ЭДТА, исключавшего все эффекты комплемента, полностью подавляли НСТ-тест в реакциях с РКП (табл. 1).

На следующем этапе работы мы попытались установить, способны ли рибосомные компоненты *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *K. pneumoniae* и мембранные протеогликаны *K. pneumoniae* менять восприимчивость нейтрофилов к последующим (микробным или иным) стимулам. Для этого, лейкоцитарную взвесь, содержащую нейтрофилы, предварительно инкубировали с комплексом РКП в дозировках ниже его ХЛ-стимулирующего действия (0,02 мг/мл), после чего исследовали зимозан-индуцированную ХЛ нейтрофилов. Было установлено, что РКП не меняют способность нейтрофилов активироваться в присутствии опсонизированного зимозана ($p=0,245384$). Это отличало РКП от липополисахаридного эндотоксина *E. coli*, который в параллельных опытах способен был увеличивать восприимчивость нейтрофилов в отношении опсонизированного зимозана в 1,6-2,4 раза ($p=0,020922$).

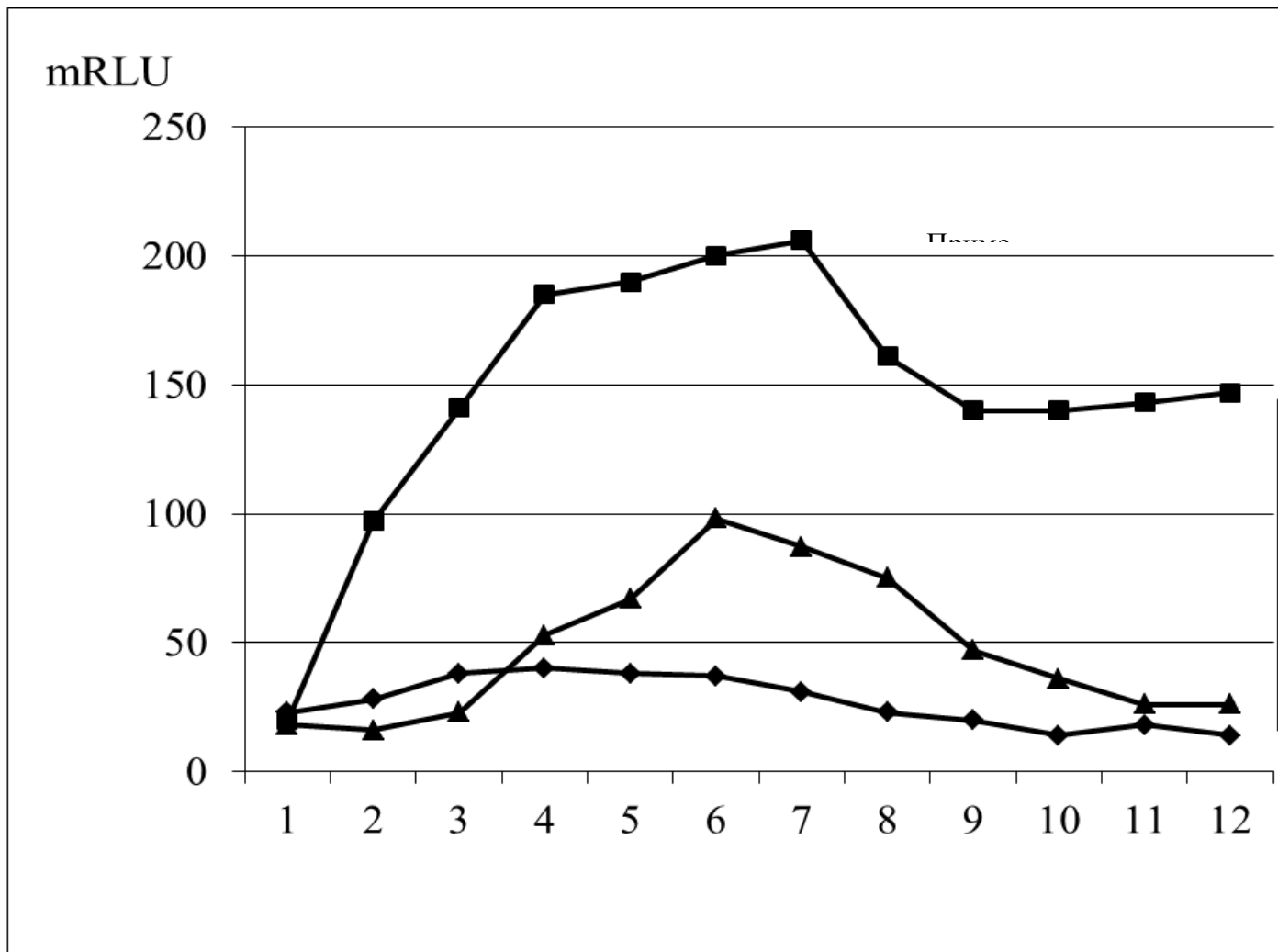


Рисунок 5 – Влияние комплекса рибосомальных компонентов и протеогликанов бактерий на люминол-зависимую хемилюминесценцию нейтрофилов крови (типовой эксперимент); где ОЗ – опсонизированный зимозан, РКП – рибосомальные компоненты и протеогликаны бактерий.

Влияние комплекса рибосомальных компонентов *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Klebsiella pneumoniae* и протеогликанов *Klebsiella pneumoniae* на биопленку *Pseudomonas aeruginosa*

Известно, что нормальная микрофлора слизистых оболочек – это сообщество, представленное, преимущественно, в виде биопленки (Рыбальченко О.В., 2008). При исследовании влияния рибосомных компонентов и протеогликанов бактерий, колонизирующих респираторный тракт, на процессы, происходящие в микробных сообществах, в качестве экспериментальной бактериальной ассоциации была использована биопленка *Pseudomonas aeruginosa*, выращенная *in vitro*.

Раствор РКП вносили в культуральную среду непосредственно в начале культивирования *P. aeruginosa* в лунках планшета, а также добавляли к сформированной биопленке. Оптическая плотность негативного контроля (образец без *P. aeruginosa*) составила $0,40 \pm 0,03$ отн. свет. ед., позитивного

контроля (рост биопленки без воздействия) – $1,43 \pm 0,02$ отн. свет. ед. РКП не препятствовали формированию биопленки. Так, оптическая плотность полученных экспериментальных образцов не отличалась от позитивного контроля и составляла $1,44 \pm 0,03$ отн. свет. ед. ($p=0,441685$). Близкие результаты были получены при изучении влияния метаболитов *S. epidermidis* на формирование биопленки: $1,40 \pm 0,04$ отн. свет. ед. – для штамма 178М и $1,39 \pm 0,03$ отн. свет. ед. – для штамма 327/5. В то же время, действие метаболитов *S. aureus* существенно влияло на формирование бактериального сообщества. Полученные данные оптической плотности составили $0,71 \pm 0,05$ отн. свет. ед.; $0,84 \pm 0,03$ отн. свет. ед.; $0,91 \pm 0,04$ отн. свет. ед. и $0,86 \pm 0,02$ отн. свет. ед. для штаммов 5983/2, 5663, 5583 и 18А соответственно ($p=0,000000$, $p=0,000000$, $p=0,000000$, $p=0,000000$) (рис. 6).

При внесении РКП в лунки с уже сформированной биопленкой были получены сходные результаты (рис.7). Оптическая плотность препаратов, в которые вносили РКП, не отличалась от положительного контроля – $1,37 \pm 0,06$ отн. свет. ед. ($p=0,409494$). Биопленки также не были чувствительны к продуктам *S. epidermidis*: $1,39 \pm 0,03$ отн. свет. ед. для штамма 178М и $1,38 \pm 0,03$ отн. свет. ед. для штамма 327/5 ($p=0,331285$, $p=0,200241$). В то же время биопленка была чувствительна к продуктам экскреции *S. aureus*, подвергаясь ферментативному расщеплению – $0,79 \pm 0,04$ отн. свет. ед. (5983/2), $0,96 \pm 0,06$ отн. свет. ед. (5663), $0,99 \pm 0,08$ отн. свет. ед. (5583), $0,95 \pm 0,08$ отн. свет. ед. (18А) ($p=0,000000$, $p=0,000000$, $p=0,000001$, $p=0,000000$ по сравнению с положительным контролем) (рис. 7).

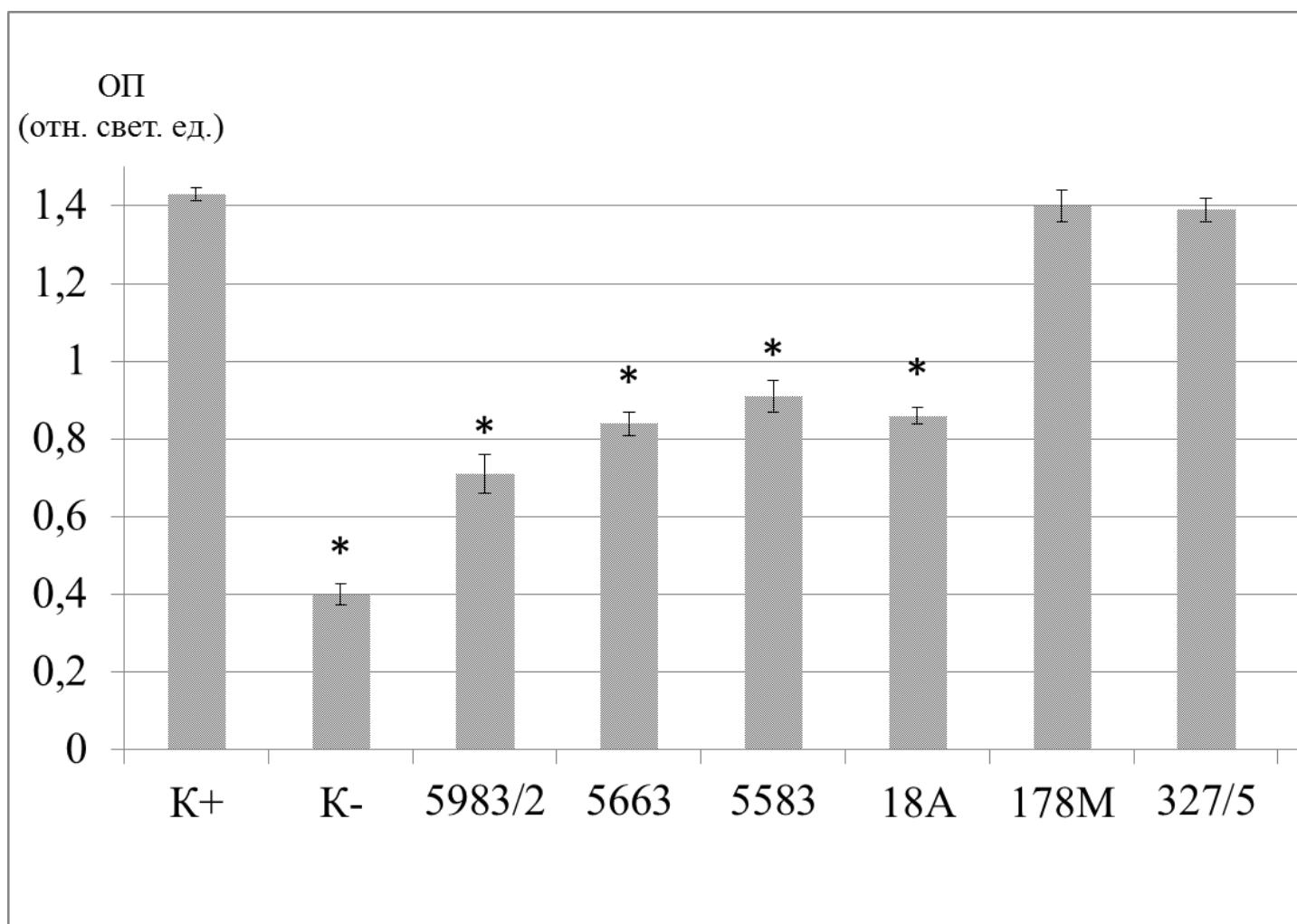


Рисунок 6 – Влияние комплекса рибосомальных компонентов и протеогликанов бактерий и фильтратов бульонных культур стафилококков на формирование биопленки, образованной *P. aeruginosa*.

Примечание: * – статистически значимые различия относительно позитивного контроля, РКП – рибосомальные компоненты и протеогликаны бактерий, 5983/2, 5663, 5583, 18A – штаммы *S. aureus*, 327/5, 178M – штаммы *S. epidermidis*

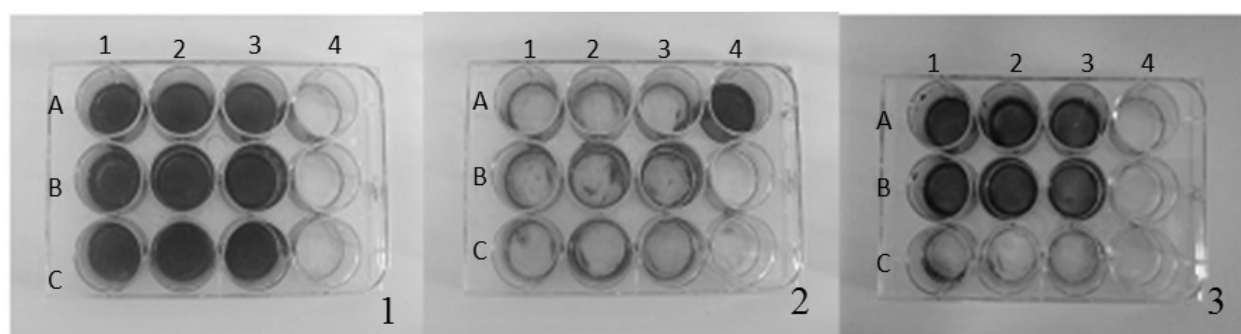


Рисунок 7 – Воздействие на биопленку *P. aeruginosa*, рибосомальных компонентов и протеогликанов бактерий и фильтратов бульонных культур стафилококков.

Примечание: **1:** A1, A2, A3 – позитивный контроль; B1, B2, B3 – рибосомальные компоненты и протеогликаны бактерий; C1, C2, C3 – *S. epidermidis* (178M); A4, B4, C4 – лунки, не засеянные *P. aeruginosa* (негативный контроль); **2:** A1, A2, A3 – *S. aureus* (5983/2); B1, B2, B3 – *S. aureus* (5583); C1, C2, C3 – *S. aureus* (5663); A4 – позитивный контроль; B4, C4 – лунки, не засеянные *P. aeruginosa* (негативный контроль); **3:** A1, A2, A3 – позитивный контроль; B1, B2, B3 – *S. epidermidis* (327/5); C1, C2, C3 – *S. aureus* (18A); A4, B4, C4 – лунки, не засеянные *P. aeruginosa* (негативный контроль).

Исследование содержания антител к рибосомальным компонентам *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Klebsiella pneumoniae* и протеогликанам *Klebsiella pneumoniae* в сыворотке крови здоровых людей и больных с различными патологиями

Позитивный контрольный образец (нормальный иммуноглобулин человека) давал реакции в разведении 1:1280. При истощении иммуноглобулина комплексом РКП реакции блокировались, что говорит о специфичности связывания.

Для взрослых здоровых доноров (22-52 года) разброс титров антител составлял от 0 до 1:1600 ($Me=1:40$), для здоровых детей (11-14 лет) – от 1:10 до 1:320 ($Me=1:80$) (табл. 2, рис. 8).

Более высокая медиана титра антител (встречаемость) к данным РКП у детей, по-видимому, не была связана с большей, чем у взрослых, выраженностью иммунных реакций в ответ на патогены. Скорее всего, это говорит о том, что дети школьного возраста, находясь в организованных коллективах, при тесных контактах чаще обмениваются респираторной флорой и, следовательно, инфицируются (в том числе субклинически) бактериями *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae* и *K. pneumoniae*, чем взрослые люди.

О том, что индукция антителообразования происходит постоянно, говорят данные нашего изучения разных классов антител у здоровых детей, которые имели не только IgG, но также IgM ($Me=1:160$), присутствие которых

Таблица 2 – Содержание IgG к комплексу рибосомальных компонентов *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae* и *K. pneumoniae* и протеогликанов мембраны *K. pneumoniae* в сыворотке крови детей: здоровых и с различными патологиями

Группа	n	$M \pm m$	Me	25%	75%	p (относительно контроля)
Здоровые дети	35	1:99,7 \pm 13,2	1:80	1:40	1:160	-
Бронхиальная астма	34	1:962,4 \pm 86,8*	1:1280	1:160	1:1280	0,000000
Муковисцидоз	18	1:326,3 \pm 88,2*	1:160	1:40	1:320	0,014744
Восп. заболевания	30	1:290,3 \pm 74,7	1:80	1:20	1:320	0,637844

кишечника						
Хронический энтерит, целиакия	34	1:177,8±43,2	1:80	1:40	1:170	0,800250
Хронический гастродуоденит	14	1:162,9±86,9	1:60	1:40	1:160	0,816244
Атопический дерматит	10	1:185,0±82,1	1:30	1:10	1:320	0,469389
Хронический вирусный гепатит	31	1:190,0±62,2	1:40	1:20	1:160	0,403062

Примечание: n – количество детей в исследуемой группе, Me – медиана,

* – статистически значимые различия относительно группы здоровых детей.

доказывает частый контакт (Москалев А.В., 2015) с внутренними структурами бактерий, способными колонизировать респираторный тракт.

Одним из осложнений респираторных инфекций является бронхиальная астма – заболевание, в патогенезе которого задействованы различные механизмы, в частности инфекционные агенты (Балаболкин И.И., 1998, Хаитов М.Р., 2003, Kim H.Y. et al., 2010, Umetsu D.T., DeKruyff R.H., 2010, Hammad H., Lambrecht B.H., 2011, Holgate S.T., 2011, Proud D., Leigh R., 2011). Приступы бронхиальной астмы могут зависеть от респираторных аллергенов (Murphy D.M., O'Byrne P.M., 2010), предполагают, что бактериальные инфекции могут быть пусковыми агентами, обостряя хроническое воспаление, либо являются одним из факторов, которые служат предвестником бронхиальной астмы (Hales B.J. et al., 2008, Jackson D.J. et al., 2008, Korppu M., 2010). Содержание антител к РКП бактерий, способным колонизировать респираторный тракт – *S. pyogenes*, *S.pneumoniae*, *H. influenzae*, *K.pneumoniae* – у детей с бронхиальной астмой было в 16 раз выше, чем у здоровых школьников (Me=1:1280 против Me=1:80, p=0,000000). Это говорит о том, что дети, страдающие бронхиальной астмой, имеют рецидивирующие инфекции респираторного тракта (либо бактерионосительство), связанные с одним или несколькими видами вышеуказанных бактерий.

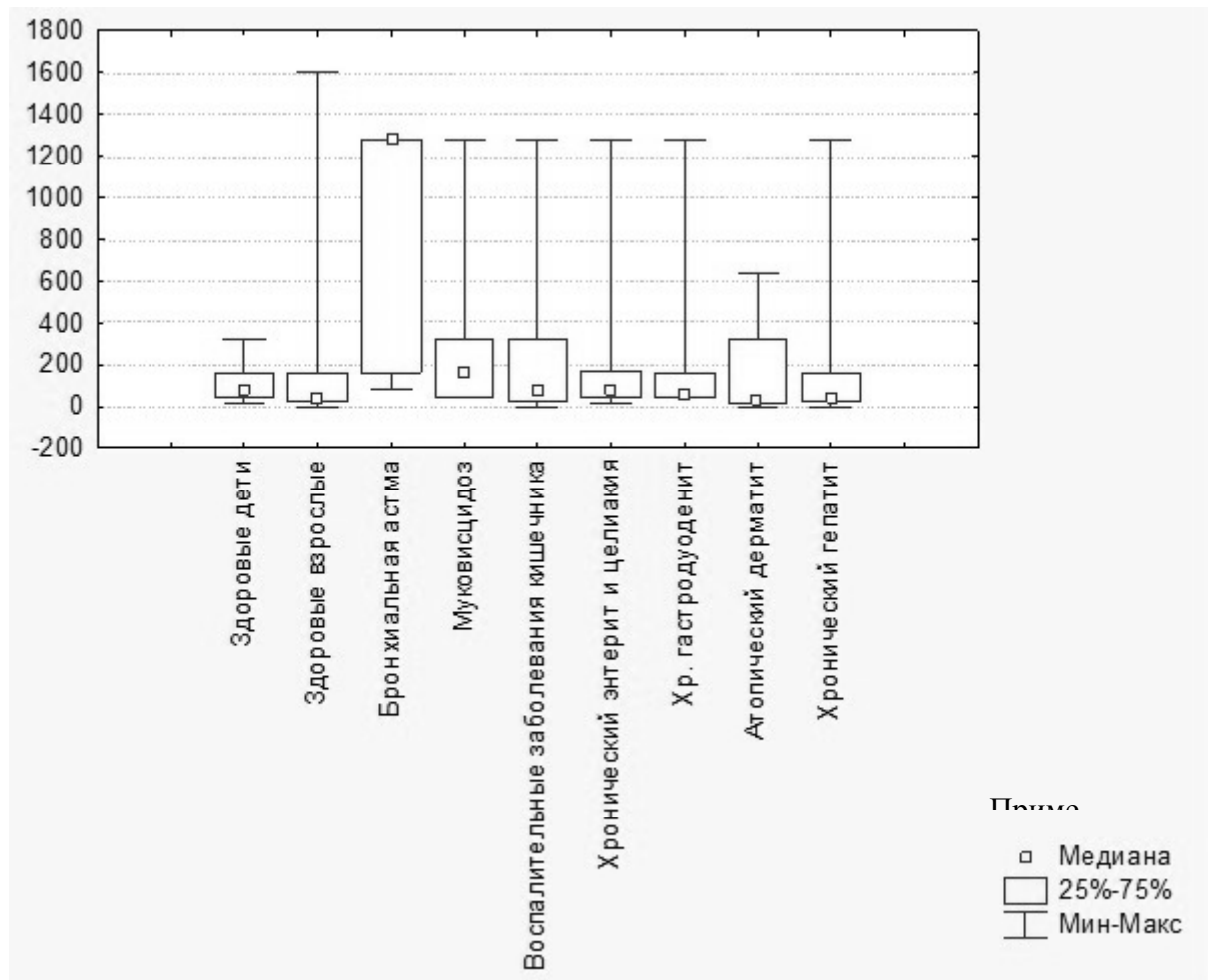


Рисунок 8 – Содержание сывороточных IgG к комплексу рибосомальных компонентов *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae* и *K. pneumoniae* и протеогликанов *K. pneumoniae* в группах здоровых (взрослые и дети) и больных детей.

У детей, больных муковисцидозом, содержание антител было выше, чем у здоровых детей ($Me=1:80$ и $Me=1:160$ соответственно, $p=0,014744$). Это указывало на то, что для данной группы детей характерна повышенная контаминация патогенами и сопутствующие инфекции (Lee B. et al., 2011), поскольку снижен мукоцилиарный клиренс. В то же время, титр антител при муковисцидозе был значительно ниже, чем при бронхиальной астме ($Me=1:160$ против $Me=1:1280$, $p=0,000054$), что свидетельствовало об ином характере патогенеза заболевания.

Следует отметить, что у детей с воспалительными заболеваниями толстого кишечника, хроническим энтеритом и целиакией, атопическим дерматитом, хроническим гастродуоденитом и хроническими вирусными гепатитами не выявлено существенных различий в титре антител (IgG) к РКП бактерий, вызывающих респираторные инфекции, по сравнению с результатами группы здоровых детей (табл. 2, рис. 8) ($p>0,05$). Это показывает, что наличие данных патологий принципиально не увеличит риск развития респираторных инфекций, связанных с *S. pyogenes*,

S. pneumoniae, *H. influenzae* и *K. pneumoniae*. В свою очередь, анализ пуповинной крови показал, что новорожденные дети имели ту же встречаемость антител (IgG) к РКП, что и взрослые люди ($Me=1:40$), что неудивительно, поскольку они получали данные иммуноглобулины путем трансплацентарной передачи.

Заключение

Таким образом, наши исследования показали, что рибосомные компоненты *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*, *K. pneumoniae* и *H. influenzae* и протеогликаны мембраны *K. pneumoniae* стимулируют защитные функции эпителиоцитов слизистых оболочек: как через стимуляцию секреторной функции буккальных эпителиоцитов, так и через подавление рецепторной активности буккальных клеток в отношении оппортунистических патогенов, таких как *C. albicans*.

При проведении экспериментов с нейтрофильными гранулоцитами – одними из основных эффекторов «первой линии» защиты при микробных инвазиях, было выявлено, что рибосомальные компоненты *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*, *K. pneumoniae*, *H. influenzae* и протеогликаны *K. pneumoniae* способны вызывать активацию кислород-зависимого метаболизма нейтрофилов, в том числе, через опсонин-зависимые реакции с участием классического каскада комплемента. В то же время, рибосомные компоненты и протеогликаны данных бактерий не усиливают чувствительность нейтрофильных гранулоцитов к последующим стимулам.

Нами было установлено, что внутренние компоненты *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*, *K. pneumoniae* и *H. influenzae*, такие как рибосомные структуры и протеогликаны мембранной части, не влияют на формирование и жизнедеятельность устойчивых микробных сообществ на примере биопленки, сформированной *P. aeruginosa*. В то же время, фильтраты бульонных культур *S. aureus* нарушали формирование и структуру биопленки, тогда как метаболиты *S. epidermidis* не обладали подобной активностью. Это показывает неоднозначное влияние секреторных продуктов и иных компонентов бактерий на реализацию антагонистических взаимоотношений внутри микробной ассоциации.

Было обнаружено, что в крови большинства (95,03%) обследованных здоровых людей и детей с различными хроническими патологиями присутствуют антитела рибосомальным компонентам *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*, *K. pneumoniae* и *H. influenzae* и протеогликанам *K. pneumoniae*. Это говорит о широкой циркуляции данных микроорганизмов среди населения, и, как следствие, периодическом инфицировании. У детей с бронхиальной астмой и муковисцидозом были выявлены более высокие титры IgG к внутренним компонентам вышеуказанных микроорганизмов, чем у здоровых, что может свидетельствовать о более интенсивной контаминации данными патогенами и снижении уровня колонизационной резистентности слизистых оболочек. С другой стороны, повышенный титр антител к

рибосомальным компонентам бактерий может быть отражением инфекционно-аллергической гипотезы происхождения бронхиальной астмы.

По данным литературы известно, что у здоровых детей и детей с бронхиальной астмой присутствуют IgG1, IgG4 и IgE антитела к поверхностным консервативным антигенам *H. influenzae* и *S.pneumoniae* (Hales B.J. et al., 2008, Hollams E.M. et al., 2010), причем, титр антител выше у здоровых, чем у больных с бронхиальной астмой (Hales B.J. et al., 2011). Это противоречие можно объяснить тем, что динамика антителообразования различна для протективных антигенов и внутренних компонентов бактерий. Можно предположить, что при низком титре антител к протективным антигенам патогенов, колонизирующих респираторный тракт, увеличивается частота реинфицирования, удлиняется время контакта с различными антигенами микроорганизма и, как следствие, возрастают титры антител к внутренним компонентам, например, рибосомным структурам и протеогликанам мембраны бактерий.

Выводы

1. Рибосомальные компоненты *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*, *K. pneumoniae*, *H. influenzae* и протеогликаны *K. pneumoniae* меняют функциональный статус мукозальных клеток через подавление клеточной рецепторной активности и усиление секреторной активности, что вызывает снижение адгезии в экспериментальной тест-системе «буккальные эпителиоциты – *C. albicans*».
2. Комплекс рибосомальных компонентов и протеогликанов бактерий обладает стимулирующим действием на нейтрофилы за счет усиления образования активных форм кислорода, при этом реакции на последующие стимулы не усиливаются.
3. Рибосомальные компоненты *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*, *K. pneumoniae*, *H. influenzae* и протеогликаны *K. pneumoniae*, а также метаболиты суточных культур *S. epidermidis* не влияют на формирование и структурную целостность биопленки, образованной *P. aeruginosa*. Метаболиты суточных культур *S. aureus* препятствуют образованию биопленки *P. aeruginosa* и вызывают ее деструкцию.
4. В сыворотке крови различных групп пациентов обнаружены IgG к рибосомальным компонентам *S. pyogenes*, *S.pneumoniae*, *K. pneumoniae*, *H. influenzae* и протеогликанам *K. pneumoniae*. Антитела к ним присутствуют в низких титрах у здоровых взрослых и детей, а также детей с хроническими воспалительными заболеваниями толстого кишечника, хроническим энтеритом и целиакией, хроническим гастроудоденитом, атопическим дерматитом и хроническими вирусными гепатитами. У детей с бронхиальной астмой и муковисцидозом выявлено существенное превышение встречаемости высоких титров IgG к рибосомальным компонентам и протеогликанам бактерий по сравнению с остальными обследованными группами.

Практические рекомендации

1. Представленные сведения о механизмах действия рибосомных компонентов *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*, *K. pneumoniae*, *H. influenzae* и протеогликанов *K. pneumoniae* на биопленку *P. aeruginosa* могут быть использованы для проведения дальнейших исследований с различными микробными ассоциациями, а так же для изучения влияния других компонентов вышеуказанных микроорганизмов на процессы формирования и отторжения биопленки.
2. Полученные данные о взаимодействии рибосомальных компонентов и протеогликанов бактерий с различными факторами микробной резистентности позволяет рекомендовать их использование для направленной стимуляции мукозальных эпителиоцитов при снижении резистентности слизистых оболочек верхних дыхательных путей.

Перспективы дальнейшей разработки темы

Дальнейшие исследования будут направлены на изучение механизмов воздействия субкомпонентов *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*, *K. pneumoniae* и *H. influenzae* на различные звенья мукозальной системы противoinфекционной защиты. Планируется изучение количественного и качественного состава микробиоты верхних дыхательных путей у детей с различными хроническими заболеваниями.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Маянский, А.Н. *Pseudomonas aeruginosa*: характеристика биопленочного процесса / Маянский А.Н., Чеботарь И.В., Руднева Е.И., Чистякова В.П. // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2012. – №1. – С. 3-8.
2. Маянский, А.Н. Межвидовое взаимодействие бактерий и образование смешанной (полимикробной) биопленки / Маянский А.Н., Чеботарь И.В., Евтеева Н.И., Руднева Е.И. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2012. – №1. – С. 93-101.
3. Руднева, Е.И. Содержание антител к рибосомальным белкам бактерий у здоровых детей и больных бронхиальной астмой / Руднева Е.И., Маянская И.В., Блинова Т.А. // Вопросы диагностики в педиатрии. – 2012. – Т. 4. – №2. – С. 5-7.
4. Руднева, Е.И. Антитела к рибосомальным белкам респираторных бактерий в сыворотке крови у здоровых доноров и детей с различными хроническими заболеваниями / Руднева Е.И., Маянская И.В., Маянский А.Н. // Иммунология. – 2012. – №5. – С. 260-263.
5. Руднева, Е.И. Содержание антител к рибосомальным белкам бактерий респираторного тракта у здоровых доноров и детей с бронхиальной астмой / Руднева Е.И., Маянская И.В. // Материалы I Всероссийской XII научной сессии молодых ученых и студентов с международным участием

- "Современные решения актуальных научных проблем в медицине". Медиаль. – Нижний Новгород, 2013. – №1 (6). – С.74-75.
6. Лукова, О.А. Влияние препарата «Рибомунил» на взаимодействия щёчных эпителиоцитов с *Candida albicans* in vitro / Лукова О.А., Руднева Е.И. // Материалы научно-практической конференции по медицинской микологии (XVI Кашкинские чтения). Проблемы медицинской микологии. – Санкт-Петербург, 2013. – Т. 15. – № 2. – С. 100.
 7. **Руднева, Е.И. Влияние рибосомальных белков респираторных бактерий на адгезивные свойства буккальных эпителиоцитов / Руднева Е.И., Лукова О.А., Маянский А.Н. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2014. – №2. – С. 85–90.**
 8. Руднева, Е.И. Влияние рибосомальных белков бактерий респираторного тракта на фагоцитарную активность нейтрофилов крови / Руднева Е.И., Маянский А.Н. // Материалы Всероссийской научно-практической конференции, посвященной 95-летию ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной. Инновационные технологии в противоэпидемической защите населения. – Нижний Новгород, 2014. – С. 157-160.

Список сокращений

ЗФР	забуференный физиологический раствор	РКП	рибосомальные компоненты и протеогликаны бактерий
ЛПС	липополисахарид	ТСБ	трипсинизированный соевый бульон
ИГ	иммуноглобулин		
НАДФН	никотинамидадениндинуклеотидфосфат восстановленный	ФСР-Т	фосфатно-солевой раствор с твином
НСТ	нитросиний тетразолий	ХЛ	хемилюминесценция
ОЗ	опсонизированный зимозан	ЭГТА	этиленгликольтетраацетат
		ЭДТА	этилендиаминтетраацетат

Благодарности

Автор искренне благодарен научным руководителям Маянскому А.Н. и Заславской М.И. за ценные советы на различных этапах выполнения работы. Автор выражает признательность ведущему научному сотруднику ФГБУ ННИИ ДГ Минздрава России Маянской И.В. за организацию совместных лабораторных исследований биоматериала, а также доценту кафедры факультетской и поликлинической педиатрии ФГБОУ ВО НижГМА Минздрава России Абелевич М.М. за помощь в формировании групп пациентов. Также автор благодарит всех соавторов, принимавших участие в научном исследовании.

КРЕСТОВА ЕКАТЕРИНА ИВАНОВНА

А в т о р е ф е р а т

ВЛИЯНИЕ РИБОСОМАЛЬНЫХ КОМПОНЕНТОВ И ПРОТЕОГЛИКАНОВ БАКТЕРИЙ
НА МИКРОБНЫЕ СООБЩЕСТВА И МЕХАНИЗМЫ ПРОТИВОИНФЕКЦИОННОЙ
РЕЗИСТЕНТНОСТИ